



Návod k použití pro Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Verze 2

Září 2011

1. Použití

Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test se používá k monitorování laboratorních prostor a vybavení na kontaminaci PCR amplikony, k níž může dojít při používání produktů Biofortuna SSPGo.

2. Úvod

PCR je citlivá technika, která je náchylná ke kontaminaci DNA amplikonem z předchozí PCR. Kontaminace může vést k falešně pozitivní amplifikaci v následujících PCR, a tudíž k nesprávné genotypizaci. PCR amplikon může kontaminovat reagentie a vzorky, ale i laboratorní vybavení, například pipety. Znamky kontaminace reagentií a vybavení je nutné pravidelně monitorovat.

3. Popis testu

Každý SSPGo HLA Wipe Test se skládá z proužku s osmi PCR jamkami obsahujícími lyofilizovaný PCR pufr, polymerázu a primery specifické pro HLA-DRA gen a výsledkem reakce je amplikon o velikosti 187 pb z lidské genomové DNA. Všechny soupravy Biofortuna používají jako interní kontrolu DRA amplikon, a proto při jakékoli kontaminaci způsobené použitím souprav Biofortuna SSPGo dojde k amplifikaci DRA genu, který bude detekován primery wipe testu.

Každým proužkem s osmi jamkami lze provést wipe test na kontaminaci maximálně tří zón. Každý proužek obsahuje pozitivní a negativní kontrolní reakci a inhibiční kontrolní reakci pro každou zónu wipe testu. Při testování na kontaminaci se dané místo nejprve otře vatovou tyčinkou, která se pak namočí do vody. Tato voda se použije jako templát wipe testu a jako 50:50 směs s genomovou DNA jako inhibiční test PCR.

Test na kontaminaci se doporučuje provádět pravidelně. Mezi obvykle testované zóny patří oblast pro přípravu DNA (pre-PCR), oblast pro provádění PCR a oblast po amplifikaci (post-PCR). Mezi obvykle testované vybavení patří pracovní plochy, pipety, centrifugy, úchytky chladničky a mrazničky, kliky na dveřích a stojánky. Mezi obvykle testované roztoky patří pufr pro přípravu DNA a roztoky na ředění DNA. Reagentie používané k různým účelům, jako jsou PCR pufrы a *Taq* polymeráza, jsou obzvláště náchylné ke kontaminaci, ale neovlivňují soupravy Biofortuna, neboť produkty Biofortuna jsou dodávány jako celek a vyžadují pouze přidání DNA.

4. Obsah soupravy

- 12 proužků po 8 PCR jamkách. Každá jamka obsahuje 10 µl předem nadávkovaných lyofilizovaných primerů, polymerázu, dNTP* a pufr. Každý proužek zabalený ve fólii je určen k testování tří zón na kontaminaci. Rozvržení proužku na 8 reakcí je uvedeno níže.

Reakce	Barvivo	Použití
1	Červené	Pozitivní kontrola: DNA
2	Fialové	Negativní kontrola: voda použitá k namočení vatové tyčinky
3	Modré	Zóna 1 inhibiční test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
4	Fialové	Zóna 1 wipe test
5	Modré	Zóna 2 inhibiční test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
6	Fialové	Zóna 2 wipe test
7	Modré	Zóna 3 inhibiční test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
8	Fialové	Zóna 3 wipe test

- 36 sterilních vatových tyčinek
- 12 x 8 PCR uzávěrů
- 1x návod k použití
- 1x šaržový certifikát vydaný výrobcem (COA - Certificate of Analysis)
- Bezpečnostní list (MSDS) lze získat na webové stránce společnosti Biofortuna www.biofortuna.com. Pokud nemáte možnost tento dokument stáhnout z webové stránky, kontaktujte prosím lokálního distributora.

*CleanAmp™ dNTP podléhají licenci společnosti Trilink Biotechnologies Inc se svolením k použití v produktech Biofortuna SSPGo.



5. Reagencie a vybavení, které nejsou součástí dodávky

- Vhodné pipety a sterilní špičky, např. pipeta P10 s 10 μ l filtračními špičkami.
- Lidská genomová DNA v koncentraci 5–10 ng/ μ l, která se použije jako pozitivní kontrola.
- Souprava / vybavení pro izolaci DNA.
- UV spektrofotometr.
- 2ml polypropylenové zkumavky.
- Sterilní voda pro molekulárně-biologické aplikace.
- 96jamkový termocykler s vyhříváním víkem. Destičky a zkumavky PCR použité v soupravách společnosti Biofortuna byly validovány pro použití s většinou termocyklerů na trhu, včetně termocyklerů MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Jiné modely mohou vyžadovat další validaci uživatelem.
- Reagencie pro gelovou elektroforézu (agaróza, 0,5x TBE pufr, 1 000pb DNA marker molekulové hmotnosti, roztok ethidiumbromidu 10 mg/ml).
- Vybavení pro gelovou elektroforézu (gelová aparatura, síťový zdroj, gelový dokumentační systém s UV transluminátorem).

6. Bezpečnost a varování

- Test může provádět pouze náležitě vyškolený pracovník.
- Se všemi reagensy zacházejte v souladu se zásadami Správné laboratorní praxe.
- Oblasti k provádění postupu před a po PCR musí být stále oddělené. Materiál používaný po PCR nevnášejte zpět do oblasti pro postup před PCR.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Se všemi krevními deriváty zacházejte jako s potenciálně infekčními.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Ethidiumbromid je potenciální karcinogen. Při jeho použití vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Při používání zdrojů UV záření postupujte opatrně - vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Nikdy se nedívejte přímo do zdroje UV záření.
- Bezpečnostní listy jsou k dispozici na webové stránce www.biofortuna.com.

7. Skladování a stabilita

Soupravy Biofortuna SSPGo skladujte při teplotě 4–30 °C. Jakmile jsou PCR jamky vyjmuty z fólie, reagenty rehydratujte pomocí vzorku do 3 hodin. Datum expirace je uvedeno na obalu. Po uvedeném datu produkt nepoužívejte.

Soupravy, jejichž obal je poškozený, nepoužívejte.

Zajistěte, aby byly PCR jamky po nadávkování DNA důkladně utěsněny, neboť během PCR amplifikace by mohlo dojít k odpařování. Zvláštní pozornost věnujte okrajům a rohům.

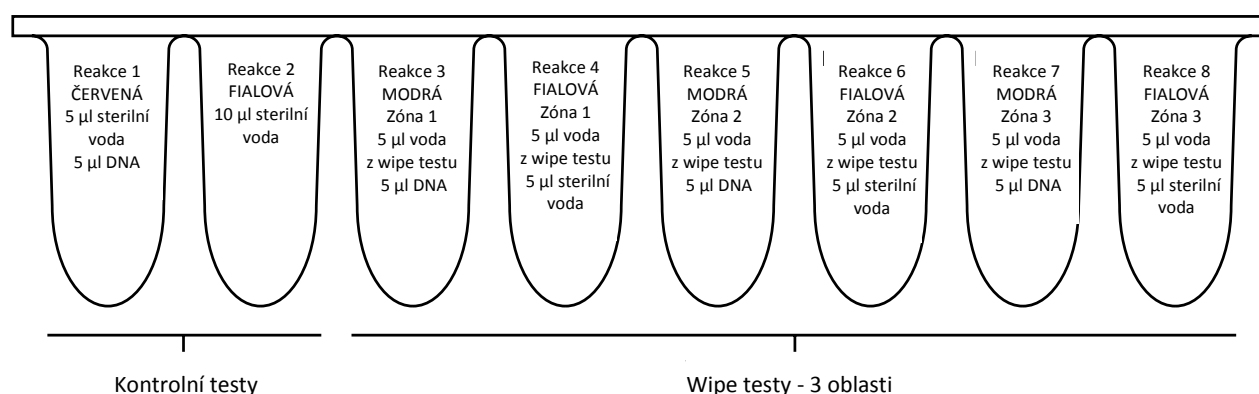
8. Pokyny k použití

Poznámka:

Častým zdrojem kontaminace jsou PCR pipety. Doporučuje se špičku pipety otřít, pokud možno uvnitř nádoby. Dále se doporučuje při veškerých testech na kontaminaci používat pipetu, která byla testována a shledána negativní. Zjistíte-li kontaminaci, odstraňte ji podle pokynů pro odstranění kontaminace platných pro vaši laboratoř a zóny otestujte znovu.

1. Na místě, kde se nepracuje s DNA, označte štítkem sterilní 2ml polypropylenovou zkumavku bez obsahu DNáz pro každou zónu určenou k wipe testování. Jednu zkumavku označte jako negativní kontrolu.
2. Pomocí pipety, u níž máte jistotu, že nebyla kontaminována, přidejte do každé 2ml zkumavky po 500 μ l sterilní destilované vody pro molekulárně-biologické aplikace.
3. V každé zkumavce pro wipe test namočte sterilní vatovou tyčinku s plastovou špejlí dodávanou v soupravě.
4. Navlhčenou vatovou tyčinkou otřete zónu určenou k testování.
5. Odlomte nebo odstříhňte plastovou špejli a vatovou tyčinku vložte do původní 2ml zkumavky s vodou.
6. Krátce promíchejte na vortexu.
7. Sterilní pinzetou vyjměte vatovou tyčinku a zlikvidujte ji.
8. Odstředějte po dobu 1 minuty při 10 000 až 13 000 rpm na mikrocentrifuze, aby se odstranily pevné částice.
9. Otevřete fólii, v níž je test zabalen. Všechny testy je nutné rehydratovat pomocí celkem 10 μ l kapaliny (viz Obrázek 1).
10. **Negativní kontrola:** Přidejte **10 μ l** sterilní vody pro molekulárně-biologické aplikace do negativní kontroly v reakci **2** (fialová).
11. Přidejte **5 μ l** sterilní vody do reakcí **1, 4, 6, 8**.
12. **Pozitivní kontrola:** Přidejte **5 μ l** lidské genomové DNA o koncentraci 10 ng/ μ l do reakce **1** (červená reakce) a reakcí **3, 5 a 7** (modré).
13. **Reakce wipe testu:** Přidejte **5 μ l** odstředěné kapaliny (vody z wipe testu) z wipe zóny 1 do reakcí **3 a 4**, z wipe zóny 2 do reakcí **5 a 6** a z wipe zóny 3 do reakcí **7 a 8**.
14. Všechny reakce mají po rehydrataci objem 10 μ l (viz Obrázek 1). Přikryjte reakce dodanými uzávěry a přejděte k obvyklým parametrům provedení SSPGo PCR podle níže uvedených pokynů.

Obrázek 1



POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE RESUSPENZE: Zajistěte, aby směsi pro PCR reakci byly resuspendovány pomocí vzorků do 3 hodin od vyjmutí panelu z fólie.

POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE VÝŠKY PROFILU DESTIČEK / PROUŽKŮ PCR: Doporučuje se, aby výška profilu destiček a proužků byla shodná, pokud jsou vloženy ve stejném přístroji pro PCR reakci. Rozdíl výšky profilů může mít za následek nedostatečný kontakt s vyhřívaným víkem přístroje pro PCR reakci. Může tak dojít k nedostatečné amplifikaci PCR nebo k jejímu selhání.

Parametry PCR

Používejte následující parametry PCR reakce. Ujistěte se, že rychlost náběhu je nejméně 1 °C za sekundu, a zapněte výhřev víka. Kompletní návod k použití je uveden v uživatelské příručce od výrobce termocykleru. Termocyklery kalibrujte podle akreditačních pravidel vydaných organizací American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) nebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturace	při teplotě 94 °C	po dobu 5 minut	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	← 10 cyklů
Anelace	při teplotě 66 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	← 20 cyklů
Anelace	při teplotě 64 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	

UDRŽUJTE PŘI TEPLITĚ 15 °C

Gelová elektroforéza

Tyto pokyny jsou platné pro horizontální elektroforézu na agarózovém gelu: Připravte 2% agarózový gel v 0,5x TBE pufru. Jakmile je gel zchlazen přibližně na 60 °C, přidejte ethidiumbromid, aby jeho konečná koncentrace byla 0,5 µg/ml. Nalijte gel a vložte hřebeny pro vytvoření mikrotitračních jamek (např. 12 x 8 jamek s 9mm mezerami). Po ztuhnutí vyjměte hřebeny a ponořte gel do roztoku 0,5x TBE pufru. Přeneste minimálně 5 µl a maximálně 10 µl z každé reakce na panelu nebo proužku do příslušné jamky v gelu a poznamenejte si pozici každé reakce. Pro určení velikosti může být užitečný 100pb ladder (velikostní marker). Gelovou elektroforézu provádějte po dobu 20 minut rychlostí 10 V/cm.

Podrobnosti týkající se specifického vybavení jsou uvedeny v návodu k použití od výrobce elektroforetického systému. Gel zobrazte pomocí UV dokumentačního systému pro gel s UV transluminátorem.

9. Interpretace

Výsledky pro testované zóny jsou platné pouze tehdy, pokud je výsledek testování pozitivní kontroly pozitivní a výsledek testování negativní kontroly je negativní.

Testy zón jsou platné pouze tehdy, pokud je příslušný inhibiční kontrolní test pozitivní.

Došlo-li ke kontaminaci PCR nebo kontaminaci DNA, měl by být zjištěn amplikon o velikosti 187 pb. Známky kontaminace PCR mohou být také šmouhy nebo pruhy různých velikostí, ale dimery primerů a další násobky primerů menší než 100 pb jsou artefakty a měli byste je ignorovat.

Reakce	Barvivo	Použití	Výsledek	Závěr	Postup
1	Červené	Pozitivní kontrola	Pozitivní na 187pb amplikon	Platný test. Vhodná DNA. Správný průběh PCR	
			Bez amplifikace	Neplatný test	Zopakujte celý test s jinou DNA kontrolou
2	Fialové	Negativní kontrola	Pozitivní na 187pb amplikon	Neplatný test. Kontaminovaná voda a/nebo pipeta	Otestujte za použití jiné vody a pipety
			Bez amplifikace	Platný test. Nekontaminovaná voda	
3, 5, 7	Modré	Inhibiční test	Pozitivní na 187pb amplikon	Platný wipe test. Nejsou přítomny inhibitory	
			Bez amplifikace	Neplatný wipe test. Jsou přítomny potenciální inhibitory	Vyčistěte oblast sterilní vodou a zopakujte test
4, 6, 8	Fialové	Wipe test	Pozitivní na 187pb amplikon	Je přítomna kontaminace	Izolujte a vyčistěte použitou pipetu. Vyčistěte kontaminovanou oblast roztokem určeným k odstranění DNA. Zopakujte test.
			Bez amplifikace	Negativní wipe test. Bez kontaminace	

10. Zajištění a kontrola kvality

Testování metodou: PCR amplikon ze soupravy Biofortuna se sušil na pevném povrchu. Wipe test byl proveden za použití neředěného amplikonu a poté amplikonu zředěného v rozmezí 1×10^1 až 1×10^{15} . Amplikon byl detekován v ředěních až do 1×10^{15} , včetně.

Genomová DNA se sušila na pevném povrchu. Wipe test byl proveden za použití genomové DNA o koncentraci 100 ng/μl a poté za použití ředění v rozmezí 1×10^1 až 1×10^{15} . DNA byla detekována v ředěních až do 1×10^3 .

11. Literatura

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Záznamový list pro vzorky

Záznamový list pro vzorky Před použitím se doporučuje tento záznamový list pro vzorky okopírovat, neboť souprava pro wipe test obsahuje testy pro 36 zón (3 zóny na každý proužek s osmi jamkami, 12 proužků v každé soupravě).

Datum testu:

Test provedl:






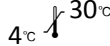


Schválil:

Další informace:

Číslo šarže soupravy:

Reakce	Barvivo	Použití (viz pokyny)	Výsledek testu	Postup	Informace o vzorku
1	Červené	Pozitivní kontrola: DNA			
2	Fialové	Negativní kontrola: voda			
3	Modré	Zóna 1 inhibiční test			
4	Fialové	Zóna 1 wipe test			
5	Modré	Zóna 2 inhibiční test			
6	Fialové	Zóna 2 wipe test			
7	Modré	Zóna 3 inhibiční test			
8	Fialové	Zóna 3 wipe test			

13. Vysvětlivky k používaným symbolům

	Počet testů
	Viz návod k použití
	Místo výroby
	Diagnostické prostředky <i>in vitro</i>
	Datum expirace
	Teplota skladování
	Číslo šarže
	Katalogové číslo

14. Kontaktní údaje výrobce

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: +44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com



15. Překlady

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

Historie revizí

Jedná se o revizi č. 2 tohoto dokumentu.
 Byly opraveny pokyny v sekci 8 a číslování sekcí.

